

Vliv různých forem glutathionu na kulturu *Lactobacillus casei* ssp. *Rhamnosus*

Zuzana Lacková^a, Markéta Komínková^a, Ondřej Zítka^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Influence of different forms of glutathione on *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* culture.

Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* (*L. rhamnosus*) of the genus *Lactobacillus* belongs to the facultatively heterofermentative lactic acid bacteria. In the human body it occurs mainly in the intestine, where it brings a beneficial effect on the immune system. Further, the antioxidant properties and action against oxidative stress belong among its major advantages. In the genus *Lactobacillus* also the ability to reduce clinical symptoms of influenza was demonstrated. Similar properties to that of the genus *Lactobacillus* are demonstrated also in glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine), one of the most important thiols present in both plant and animal tissues, and also in number of microorganisms. Due to the wide field of application of bacteria of the genus *Lactobacillus* and possibilities to improve some of their properties in the presence of glutathione, the use of lactobacilli with the addition of glutathione can be considered for the treatment of influenza and support the treatment of influenza illness.

Přijato k publikování: 5. 3. 2014

Klíčová slova: redukovaný glutathion (GSH); *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*; oxidovaný glutathion (GSSG); S-nitrosoglutathion (GSNO);

Úvod

Druh *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (*L. rhamnosus*), z rodu *Lactobacillus* patří mezi fakultativně heterofermentativní bakterie mléčného kvašení¹. Tento druh se řadí mezi probiotické bakterie, které příznivě působí na zažívací trakt člověka. Běžně se *L. rhamnosus* vyskytuje např. ve střevě či slinách člověka a ve fermentovaných mléčných výrobcích^{1,2,3}. Dřívější studie *L. rhamnosus* prokázaly příznivé působení na imunitní systém, antioxidační vlastnosti a působení proti oxidačnímu stresu⁴. Podobné vlastnosti vykazuje i glutathion (γ -glutamylcysteinylglycine) jako jedna z nejvýznamnějších thiolových sloučenin, je přítomný jak v rostlinných a živočišných tkáních, tak i u řady mikroorganismů. Podílí se na buněčných procesech, včetně ochrany proti reaktivním formám kyslíku a podporuje redoxní rovnováhu buněk^{5,6,7,8,9}. U grampozitivních mikroorganismů není jeho fyziologická úloha zcela objasněna. I když je vstup glutathionu do buněk problematický, byla zjištěna jeho výrazná ochranná role pro *L. rhamnosus*, avšak molekulární základ této vlastnosti není plně znám¹⁰. V současné době byly také prokázány příznivé účinky probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* na zažívací trakt myši a vliv těchto bakterií na snížení příznaků chřipky u myši^{11,12,13,14,15}.

Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus*

L. casei ssp. *rhamnosus*, také označovaný jako *L. rhamnosus*, patří do rodu *Lactobacillus*. Paleontologické nálezy naznačují výskyt laktobacilů již před třemi miliardami let, avšak poprvé byl rod *Lactobacillus* popsán v roce 1901 nizozemským botanikem a mikrobiologem M. W. Beijerinckem^{10,7}. *L. rhamnosus* je široce rozšířený v prostředí, nachází se v potravinách rostlinného i živočišného původu, např. nápojích, čisté i znečištěné vodě, siláži, kysaném zelí či startovacích kulturách (mlékařský průmysl). Také se vyskytuje v gastrointestinálním traktu, vagině či ústní dutině ptáků a savců^{1,2}. Patří mezi fakultativně heterofermentativní bakterie, které se vyznačují tím, že fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, nebo na směs kyseliny mléčné, mravenčí, octové a etanolu a pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou^{1,2}. Buňky *L. rhamnosus* mají tvar pravidelných tyček, které jsou většinou dlouhé a jsou uspořádány v palisádách nebo krátkých řetízcích. *L. rhamnosus* je grampozitivní a nesporulující bakterie. Má vysoké požadavky na výživu, zvláště na sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, soli, vitamíny a deriváty nukleových kyselin. Zdroj uhlíku tvoří glukóza^{5,2}. Optimální růstová teplota se pohybuje v

rozmezí 30 až 40 °C a optimální hodnota pH je 5,5 až 6,²¹. Pokud hodnota pH klesne pod 4, dochází k zastavení růstu většiny laktobacilů¹⁶. U *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* byly prokázány příznivé účinky na střevní mikroflóru a posílení imunity. U zvířat může přítomnost *L. rhamnosus* zlepšovat konverzi krmiva a tím jejich hmotnost^{10,17,18}.

Glutathion

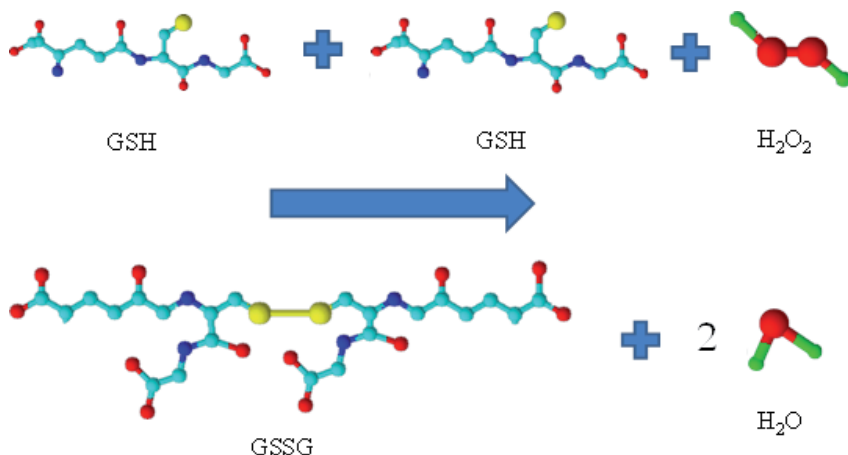
Podobné pozitivní účinky na organismus jako u *L. rhamnosus* byly zaznamenány i u glutathionu^{10,12,19}. Je to tripeptid γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin, složený ze tří aminokyselin. Patří k nejrozšířenějším a hlavním thiolovým sloučeninám vyskytujících se v mnoha organismech⁵. Vyskytuje se v rostlinných, živočišných, lidských i bakteriálních buňkách a byl izolovaný i z droždí⁸. Tato sloučenina má řadu důležitých fyziologických funkcí, jako jsou antioxidační vlastnosti, je kofaktorem enzymů, chrání volné thiolové skupiny bílkovin při redoxních reakcích, účastní se detoxikace volných peroxidů a radikálů, hraje roli v metabolismu a transportu oxidu dusnatého a aminokyselin a vytváří rezervní thiolové skupiny. Účastní se také detoxikace xenobiotik, kde je glutathion hlavní sloučeninou vystupující z této reakce^{9,19,20}. Glutathion se vyskytuje ve dvou formách. V redukované formě se jedná o thiol (GSH) a v oxidované formě o disulfid (GSSG)¹⁹.

S-nitrosogluthation (GSNO)

S-nitrosogluthation je také zkoumán v souvislosti s probiotickými bakteriemi, hlavně při zkoumání oxidativního stresu u rodu *Lactobacillus*¹¹. Je to nejrozšířenější nízkomolekulární S-nitrosothiol, který vzniká v aerobním prostředí reakcí redukovaného glutathionu (GSH) s reaktivními formami dusíku (kyselina dusitá). Také může vznikat jako meziprodukt metabolismu oxidu dusnatého (NO). GSNO hraje důležitou roli při udržování fyziologické hladiny celkových nízkomolekulárních i vysokomolekulárních S-nitrosothiolů v buňkách²¹. Také tvoří součást fyziologické funkce oxidu dusnatého (NO) a zdroj biologicky dostupného NO. Oxid dusnatý vzniká z GSNO v anaerobních podmínkách⁶

Mechanismus transportu glutathionu v buňkách u grampozitivních bakterií

Některé studie grampozitivních bakterií naznačují schopnost těchto bakterií přepravovat glutathion z média a následně ho využít v buněčných reakcích. Schopnost grampozitivních bakterií vázat glutathion z média je prokazována transportním proteinem CydCD, který je složený z dvou podjednotek CydC a CydD (Obr: 1). Tento protein pomáhá v buňce vytvářet redukční prostředí, které umožňuje lepší transport glutathionu a cysteinu. Pokud má bakterie schopnost přepravovat glutathion z média, musí tento transport-



Obr. 1: Vznik oxidovaného glutathionu (GSSG) z glutathionu redukovaného (GSH) - Spojením dvou molekul GSH přes atom Síry (žlutá barva), dochází ke vzniku molekuly GSSG vlivem tvorby disulfidické skupiny S-S (žlutá barva)

ní protein obsahovat. Na metabolismu glutathionu se podílejí dva enzymy, které přeměňují glutathion na oxidovanou (GSSG) a redukovanou (GSH) formu. Enzym glutathion peroxidáza umožňuje přeměnu GSH na GSSG, kdežto glutathion reduktáza mění GSSG zpět na GSH¹⁹. Biosyntéza GSH začíná tvorbou peptidové vazby mezi cysteinem a kyselinou glutamovou za katalýzy γ -glutamylcystein syntetázy. Následně dochází pomocí glutathion syntetázy k vytvoření peptidové vazby mezi γ -glutamylcysteinem a glycinem¹⁹ (Obr. 1).

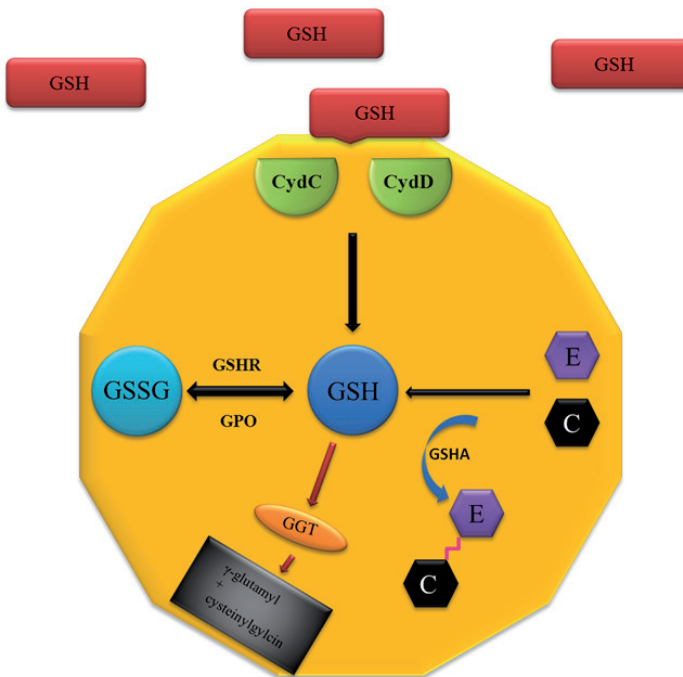
Vznik γ -glutamylcysteinu a glycinu (E-C) spojením C a E se uskutečňuje pomocí γ -glutamylcystein syntetázy (GSHA). Vstup glutathionu z média do buňky by měl být umožněn transportním proteinem CydCD. Přeměnu redukované formy glutathionu (GSH) na oxidovanou formu (GSSG) zajišťuje enzym glutathion peroxidáza (GPO) a enzym glutathion reduktáza (GSHR) umožňuje opačnou přeměnu glutathionu. Působení degradačního enzymu (GGT) dochází k degradaci glutathionu na γ -glutamyl a cyteinyglycin.

Jelikož mechanismus vstupu a tvorby glutathionu u grampozitivních buněk není zcela objasněn, je toto

schéma pouze možností, jak by transport glutathionu mohl probíhat.

Vliv probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* na klinické příznaky chřipky

Na základě zjištěných účinků probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* se současné studie zaměřují také na zmírnění klinických příznaků chřipky⁶. Ve studiích je vliv probiotických bakterií zkoumán u myši, které byly infikovány chřipkovým virem H1N1. Infikovaným myším byl perorálně podáván probiotický kmen *Lactobacillus* a sledovala se koncentrace interferonu- α . Interferon- α je glykoprotein, který je syntetizován leukocyty a má antivirové účinky. Data získaná v těchto studiích potvrdila snížení klinických příznaků chřipky u myši při každodenním podávání probiotické kultury o hmotnosti 10 mg. Také anti-oxidační vlastnosti glutathionu by mohli podpořit působení probiotických bakterií, a tím i docílit snížení klinických příznaků chřipky. Z výsledků těchto studií vyplývá možné budoucí využití probiotických bakterií při léčbě chřipky^{12,13,5}.



Obr. 2: Schéma pravděpodobného vstupu glutathionu do buňky u grampozitivních bakterií^{17,5} –Glutathion (GSH) se skládá z glycinu (G), z cysteinu (C) a z kyseliny glutamové (E).

Závěr

Probiotické kmeny rodu *Lactobacillus* mohou zmírňovat klinické příznaky chřipky a příznivě působit na zažívací trakt. Vzhledem k široké oblasti využití bakterií rodu *Lactobacillus* a možnosti zlepšení některých jejich vlastností v přítomnosti glutathionu, je možné uvažovat o využití lactobacilů s přídavkem glutathionu pro léčbu chřipky a podpořit tak léčbu chřipkových onemocnění. Uvedené informace ukazují velký potenciál mikroorganismů v léčbě virových onemocnění. V současné době byly pokusy prováděny pouze na myších, avšak do budoucna by mohly být tyto bakterie využity i při léčbě virových onemocnění u lidí.

Tato práce byla financována z projektu CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

Literatura

- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, 2007.
- Collins M. D., Phillips B. A., Zanoni P.: International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 105 (1989).
- Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.: American Journal of Clinical Nutrition, 73, 365S (2001).
- Kamaladevi A., Ganguli A., Kumar M., Balamurugan K.: Pesticide Biochemistry and Physiology, 105, 213 (2013).
- Masip L., Veeravalli K., Georgioui G.: Antioxidants & Redox Signaling, 8, 753 (2006).
- Broniowska K. A., Diers A. R., Hogg N.: Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 1830, 3173 (2013).
- Stiles M. E., Holzappel W. H.: International Journal of Food Microbiology, 36, 1 (1997).
- Li Y., Hugenholtz J., Abee T., Molenaar D.: Applied and Environmental Microbiology, 69, 5739 (2003).
- Knejzlik Z., Kas J., Ruml T.: Chemicke Listy, 94, 913 (2000).
- Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J. P.: FEMS Microbiology Reviews, 30, 487 (2006).
- Peran L., Camuesco D., Comalada M., Bailon E., Henriksson A., Xaus J., Zarzuelo A., Galvez J.: Journal of Applied Microbiology, 103, 836 (2007).
- Waki N., Yajima N., Suganuma H., Buddle B. M., Luo D., Heiser A., Zheng T.: Letters in Applied Microbiology, 58, 87 (2014).
- Park M. K., Ngo V., Kwon Y. M., Lee Y. T., Yoo S., Cho Y. H., Hong S. M., Hwang H. S., Ko E. J., Jung Y. J., Moon D. W., Jeong E. J., Kim M. C., Lee Y. N., Jang J. H., Oh J. S., Kim C. H., Kang S. M.: Plos One, 8, (2013).
- Kiso M., Takano R., Sakabe S., Katsura H., Shinya K., Uraki R., Watanabe S., Saito H., Toba M., Kohda N., Kawaoka Y.: Scientific Reports, 3, (2013).
- Hori T., Kiyoshima J., Shida K., Yasui H.: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 8, 593 (2001).
- Klaban V., Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů, Galén, 2011.
- Salminen S. J., Gueimonde M., Isolauri E.: Journal of Nutrition, 135, 1294 (2005).
- Klaenhammer T. R., Kullen M. J.: International Journal of Food Microbiology, 50, 45 (1999).
- Pophaly S. D., Singh R., Kaushik J. K., Tomar S. K.: Microbial Cell Factories, 11, (2012).
- Kullisaar T., Songisepp E., Aunapuu M., Kilk K., Arend A., Mikelsaar M., Rehema A., Zilmer M.: Applied Biochemistry and Microbiology, 46, 481 (2010).
- Kubienova L., Ticha T., Jahnova J., Luhova L., Petrivalsky M.: Chemicke Listy, 107, 202 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.